

Identifikasi Isolat *Mycobacterium bovis* Dengan Konsentrasi Dna Bertingkat Menggunakan Teknik *Polymerase Chain Reaction*
(*Identification isolate Mycobacterium Bovis With gradual Dilution Use Technic Of Polymerase Chain Reaction*)

Yohanes TRMR Simarmata

Bagian Ilmu Penyakit Dalam Veteriner Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Nusa Cendana Kupang

ABSTRACT

Mycobacterium sp. is a bacteria that can cause tuberculosis disease in domestic animals. *Mycobacterium bovis* pathogens in 3rd risk groups and Indonesia as the country's fourth-largest contributor of Tuberculosis in the world after India, China and South Africa. Based on these facts, the research was conducted to identify *M. bovis* with DNA stage concentrations, hope of the lowest concentration can be used as a reference for the detection of tuberculosis.

Isolate DNA samples obtained from the Center for Veterinary Research (BBalitvet) in Bogor, West Java. Dilution of the DNA was started from concentration 5000 pg / mL; 2500 pg / mL; 1250 pg / mL; 625 pg / mL; 312.5 pg / mL; 156.25 pg / mL; 78.125 pg / mL and 39.0625 pg / mL . DNA amplification by PCR using two pairs of primers JB21 and JB22 Forward INS1 Reverse and Forward and Reverse INS2 with predenaturasi conditions 94 ° C for 5 min, denaturation 94 ° C for 1 min, annealing 60 ° C for 1 min, 72 ° C elongation for 1 min and post-elongation 72 ° C for 7 min at 35 cycles. PCR reaction products of 500 bp and 245bp.

Analysis results can be seen in the concentration of 78.125 pg / mL and 39, 0625 pg / mL with primary INS1/INS2, bands (bands) starts to look faded and disappeared. PCR using primers JB21/JB22 showed that the concentration 39.0625 pg / mL bands had disappeared. This can be done as a source of reference for the detection of *Mycobacterium bovis* infection.

Keywords : *Mycobacterium bovis*, PCR, JB21/JB22, INS1/INS2.

PENDAHULUAN

Tuberkulosis sapi merupakan penyakit infeksius menular yang disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis* varaiian bovis (selanjutnya disebut *M. bovis*), dapat menginfeksi hewan ternak lainnya, hewan liardan manusia. *Mycobacterium bovis* termasuk dalam kelompok resiko patogen ke-3, yang artinya bakteri ini memiliki resiko sangat tinggi pada individu melalui rute

inhalasi (CDC,2009). Semua bangsa (*breed*) sapi rentan terhadap infeksi *M. bovis*, umumnya anak sapi lebih rentan terhadap infeksi dibandingkan dengan sapi dewasa.

Menurut perkiraan Badan Kesehatan Dunia (WHO) mortalitas tuberkulosis sejak tahun 1990 telah meningkat sebesar 41%. Laporan

Tuberkulosis dunia yang terbaru, menempatkan Indonesia sebagai negara terbesar nomor 4 penyumbang Tuberkulosis di dunia setelah India, Cina dan Afrika Selatan (WHO, 2011).

Tidak ada laporan tentang penularan *M. bovis* pada manusia di Indonesia. Namun bukan berarti bahwa dinegara ini tidak ada kasus tuberkulosis sapi yang menyerang manusia. Hal ini kemungkinan karena tidak dilakukan penelitian yang memadai dan kebiasaan masyarakat kita yang mengkonsumsi susu sapi yang telah dimasak terlebih dulu sehingga bakteri *Mycobacterium bovis* itu mati. Kemungkinan lain disebabkan oleh salah persepsi bahwa tuberkulosis tipe *bovine* dan tuberkulosis tipe *human* mempunyai gejalayang sama, sehingga para peneliti tidak tertarik untukmeneliti kasus *M. bovis* pada manusia.

Cara diagnosa dengan metode konvensional seperti uji *smear* dan kultur bakteri merupakan cara yang baik untuk identifikasi, namun metode ini memiliki beberapa kelemahan. Uji *smear* membutuhkan minimum 10.000 organisme/ml dan tidak dapat membedakan antara *Mycobacterium* yang patogen dengan yang tidak. Teknik identifikasi dengan cara kultur memiliki tingkat sensitif lebih tinggi dari uji *smear*, tetapi metode ini membutuhkan waktu yang lama, yaitu 6-8 minggu (Manjunath *et.al.*,1991).

Dewasa ini tengah berkembang cara diagnosa menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Melalui proses PCR, waktu dan jumlah sampel yang dibutuhkan hanya sedikit. Berdasarkan berbagai kelebihan dan kekurangan tersebut maka penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi *M. bovis* dengan berbagai konsentrasi DNA bakteri dengan harapan konsentrasi

terendah dapat digunakan sebagai deteksi penyakit tuberkulosis. Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi isolat *M. bovis* dengan konsentrasi DNA bertingkat, menggunakan teknik *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

Mycobacterium sp. adalah bakteri yang dapat menyebabkan penyakit tuberkulosis pada hewan domestik. Bakteri ini terdiri atas dua kelompok, yaitu *Mycobacterium* tuberkulosis kompleks dan *Mycobacterium* nontuberkulosis (De La Maza *et.al.*, 1997). Bakteri gram positif ini bersifat aerobik, oksidatif, tidak membentuk spora, dan non motil (Quinn *et.al.*,2002).

Mycobacterium berbentuk batang tipis panjang yang bervariasi (0,2-0,6 x 1,0-10,0µm) dan kadang memiliki bentuk cabang filament (Quinn *et.al.*,2004). Pada beberapa kondisi, *Mycobacterium* memiliki bentuk filament, tetapi fragmen akan berubah menjadi batang atau coccus jika terganggu (Timoney *et.al.*,1988). Bakteri ini tumbuh pada temperatur 33-39°C pada spesies mamalia dan temperatur 25-45°C pada spesies unggas (Hirsch *et.al.*,2004).

Mycobacterium terbagi menjadi dua kelompok, kelompok yang lambat tumbuh dan kelompok yang lebih cepat tumbuh. Kelompok yang lambat tumbuh memerlukan waktu beberapa minggu hingga dapat terlihat koloni, sedangkan sebagian besar kelompok yang lebih cepat tumbuh membutuhkan waktu 3-21 hari untuk membentuk koloni. Bakteri yang termasuk dalam kelompok lambat tumbuh adalah *Mycobacterium tuberculosis* kompleks yang terdiri atas *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium microti*, dan *Mycobacterium africanum*. Kelompok bakteri yang lebih cepat tumbuh terdiri atas *Mycobacterium avium* kompleks (Carter, 2004).

MATERI DAN METODE

Pengenceran DNA

DNA yang diperoleh dari Balai Besar Penelitian Veteriner Bogor, Jawa Barat memiliki konsentrasi 5000 pikogram/ μL . DNA *M.bovis* dibagi menjadi 8 konsentrasi (Tabel 1).

Amplifikasi DNA menggunakan primer JB21, JB22, INS1 dan INS2

Hasil isolasi DNA yang digunakan untuk cetakan pada proses amplifikasi dengan metode PCR. Primer spesifik tersebut untuk mengamplifikasi fragmen DNA sebesar 500 bp dan 245 bp. Susunan basa primer disajikan pada Tabel 2.

Komposisi campuran pereaksi PCR DNA untuk satu reaksi sebesar 25 μL adalah 12,5 μL KAPA *Taq* DNA

Polymerase readymix, (1 μL primer JB21 dan 1 μL primer JB22) atau (1 μL primer INS1 dan 1 μL primer INS2), 2 μL DNA dan 8,5 μL *water nuclease free*.

Kondisi PCR untuk amplifikasi fragmen DNA adalah *predenaturasi* pada suhu 94°C selama 2 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* atau proses penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit, *elongation* atau proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post elongation* yaitu fase untuk memastikan pemanjangan sempurna pada suhu 72°C selama 7 menit. Reaksi dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil atau data dari berbagai teknik uji dan PCR akan dianalisis secara deskriptif.

Tabel 1. Konsentrasi DNA *Mycobacterium tuberculosis*

Kode	Konsentrasi		Volume sediaan (μL)
	%	(pg/ μL)	
B1	100	5000	20
B2	50	2500	20
B3	25	1250	20
B4	12,5	625	20
B5	6,25	312,5	20
B6	3,125	156,25	20
B7	1,5625	78,125	20
B8	0,78125	39,0625	20

Tabel 2. Urutan dan jumlah nukleotida primer serta suhu *annealing temperature* dan *melting temperature* untuk amplifikasi DNA.

Primer	Susunan Basa	Σ Basa	T_m ($^{\circ}\text{C}$)
JB21	5'-TCGTCCGCTGATGCAAGTGC-3'	20	64
JB22	5'-CGTCCGCTGACCTCAAGAAG-3'	20	64
INS1	5'-CGTGAGGGCATCGAGGTGGC-3'	20	68
INS2	5'-GCGTAGGCGTCGGTGACAAA-3'	20	68

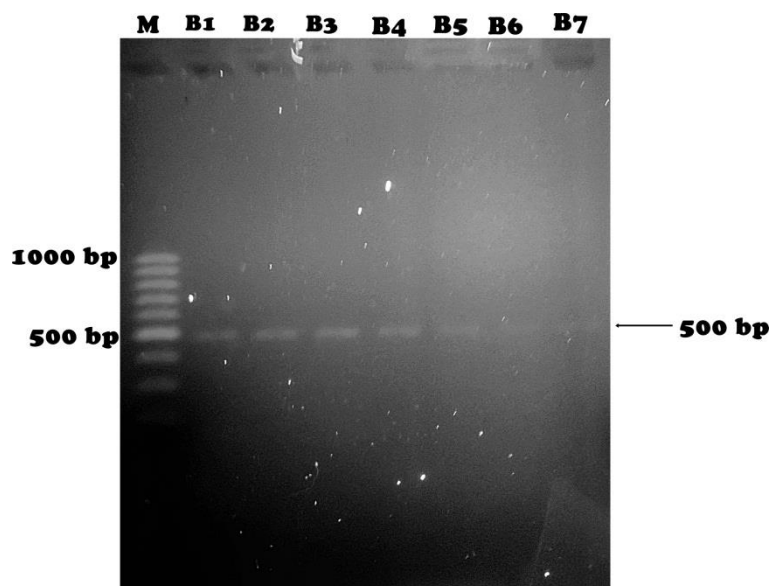
HASIL DAN PEMBAHASAN

Molekul DNA dari hasil isolat *Mycobacterium bovis* yang digunakan dalam penelitian ini dideteksi dengan menggunakan pewarnaan asam nukleat *Good ViewTM Nucleic Acid Stain* berfungsi untuk memvisualisasikan DNA pada gel agarosa. *Good ViewTM Nucleic Acid Stain* ini akan menyisip diantara basa-basa nitrogen molekul DNA sehingga jika disinari dengan sinar UV, DNA akan tampak berwarna biru.

Identifikasi produk PCR menggunakan elektroforesis gel agarose 1,5%. Elektroforesis dijalankan dengan tegangan 50volt, selanjutnya ditunggu hingga proses elektroforesis selesai. Pita band DNA dapat dilihat dengan bantuan

sinar UV (panjang gelombang 260 nm). Pita-pita DNA yang jelas terdeteksi pada primer-primer spesifik berpendar flourosensi dibawah sinar ultra violet. DNA merupakan molekul muatan negatif, sehingga bila diletakkan dimedan listrik, DNA akan bergerak dari kutub negatif ke kutub positif (Sulandari dan Zein, 2003)

DNA *M.bovis* diencerkan menjadi setengah dari konsentrasi sebelumnya sebanyak 7 kali pengenceran, yaitu 5000pg/ μ L, 2500pg/ μ L, 1250pg/ μ L, 625pg/ μ L, 325,5pg/ μ L, 156,25pg/ μ L dan 78,125pg/ μ L. Hasil dari elektroforesis dengan menggunakan primer JB21 dan JB22 dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Elektroforesis DNA *M.bovis* menggunakan primer JB21 dan JB22 pada agarose 1,5%. (M) DNA marker, (B1-B6) Konsentrasi DNA 10.000 pg; 5000 pg; 2500 pg; 1250 pg; 625 pg; 325,5 pg dan 156,25 pg.

Berdasarkan hasil elektroforesis diatas dapat dilihat karakteristik DNA *Mycobacterium bovis*. Amplifikasi DNA *M.bovis* menggunakan primer JB21 dan JB22 menghasilkan produk PCR

sepanjang 500 *basepair* (bp). Primer JB21 dan JB22 adalah primer spesifik yang digunakan untuk identifikasi *M.bovis*. Primer ini menempel pada gen target RvD1Rv2031c (Figuiredo, 2009). Hasil

elektroforesis kedelapan sumuran menghasilkan ketebalan pita-pita (band) yang berbeda-beda satu dengan yang lainnya dengan konsentrasi yang bervariasi. Konsentrasi DNA yang tinggi memperlihatkan band yang lebih tebal. Pada konsentrasi 10.000pg (B1) yang dibandingkan dengan konsentrasi DNA 156,25 pg (B7) terlihat adanya perbedaan ketebalan band yang signifikan.

Konsentrasi yang umum digunakan untuk membaca DNA pada hasil PCR adalah 5000 pg/ μ L (Mülhardt, 2003). Konsentrasi tersebut digunakan untuk mendapatkan konsentrasi band yang proporsional dan normal, namun tidak menutup kemungkinan dibawah konsentrasi tersebut tetap akan muncul bands dan terbaca di media agarose. Konsentrasi DNA sangat mempengaruhi tebal dan tipisnya band pada media agarose. Konsentrasi yang digunakan semakin rendah, maka band yang muncul akan semakin tipis, bahkan hilang pada konsentrasi tertentu karena DNA yang digunakan semakin sedikit.

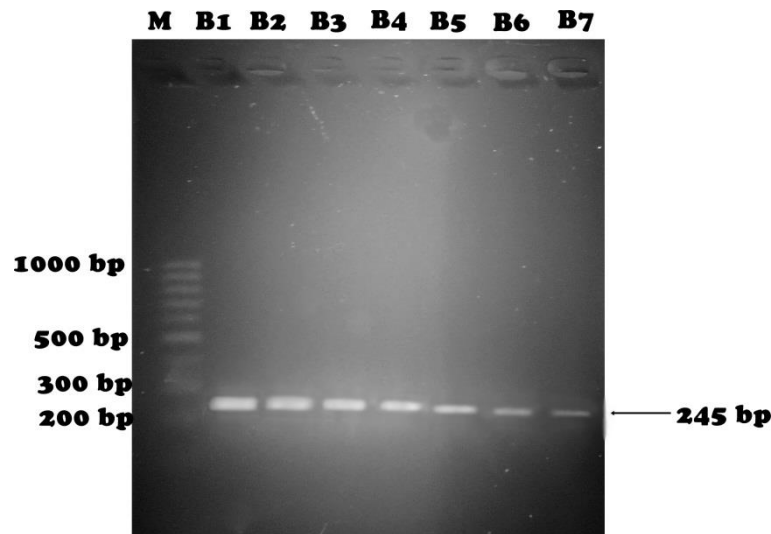
Konsentrasi DNA 156,25 pg (B7) terlihat band yang sangat tipis, bahkan hampir tidak dapat terlihat. Hal ini membuktikan bahwa DNA *M.bovis* dengan primer JB21/JB22, band yang muncul sangat tipis sehingga tidak dapat terlihat.

Uji kedua juga dilakukan pengenceran DNA sebanyak 7 tingkat dengan primer yang berbeda, yaitu INS1/INS2 yang sering digunakan untuk *M.tuberculosis* kompleks. Primer ini menempel pada gen target IS6110 (Figuiredo, 2009). DNA *M.bovis* diencerkan menjadi setengah dari konsentrasi sebelumnya sebanyak 7 kali pengenceran, yaitu 5000 pg/ μ L, 2500 pg/ μ L, 1250 pg/ μ L, 625 pg/ μ L, 325,5

pg/ μ L, 156,25 pg/ μ L dan 78,125 pg/ μ L. Hasil dari elektroforesis dengan menggunakan primer INS1 dan INS2 dapat dilihat pada Gambar 2.

Amplifikasi DNA *M.bovis* menggunakan primer INS1 dan INS2 menghasilkan produk PCR sepanjang 245 *basepair* (bp). Primer INS1 dan INS2 adalah primer yang digunakan untuk identifikasi bakteri spesies *M.tuberculosis complex*. Konsentrasi DNA yang tinggi memperlihatkan band yang lebih tebal. Pada konsentrasi 10.000pg (B1) yang dibandingkan dengan konsentrasi DNA 156,25 pg (B7) terlihat adanya perbedaan ketebalan band yang signifikan. Pada konsentrasi DNA *M.bovis* 156,25 pg (B7) pita-pita DNA masih terlihat meskipun sangat tipis.

Dari hasil kedua elektroforesis di atas terdapat perbedaan *band* yang muncul meskipun menggunakan konsentrasi dan DNA *M.bovis* yang sama. Perbedaan ini dapat disebabkan oleh berbagai hal, antara lain kesalahan teknis pencampuran dan primer yang digunakan juga berbeda. Primer JB21/JB22 spesifik untuk *M.bovis* dan primer INS1/INS2 spesifik untuk *M.tuberculosis complex* (Figuiredo, 2009). *Melting temperature* untuk primer JB21/JB22 adalah 64°C sedangkan INS1/INS2 adalah 68°C. Seharusnya waktu optimasi untuk kedua primer tersebut berbeda, namun waktu optimasi untuk kedua primer tersebut dilakukan bersamaan, yaitu *predenaturasi* pada suhu 94°C selama 2 menit, *denaturasi* pada suhu 94°C selama 1 menit, *annealing* atau proses penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit. *elongation* atau proses pemanjangan pada suhu 72°C selama 1 menit dan *post elongation* 72°C selama 7 menit. Reaksi dilakukan sebanyak 35 siklus.



Gambar 2. Elektroforesis DNA *M.bovis* menggunakan primer INS1 dan INS2 pada agarose 1.5%. (M) DNA marker, (B1-B6) Konsentrasi DNA 10.000 pg; 5000 pg; 2500 pg; 1250 pg; 625 pg; 325,5 pg dan 156,25 pg.

Hasil analisis DNA *M.bovis* menggunakan teknik PCR dengan primer spesifik JB21/JB22 dan INS1/INS2, primer JB21/JB22 mampu mendeteksi DNA pada konsentrasi 325,5 pg meskipun *band* yang dihasilkan sangat tipis serta primer INS1/INS2 mampu mendeteksi DNA hingga konsentrasi 156,25 pg.

SIMPULAN

Dari hasil dan pembahasan diatas, dapat disimpulkan bahwa Identifikasi DNA *Mycobacterium bovis* menggunakan primer JB21/ JB22 terdeteksi pada 500bp dan primer INS1/ INS2 terdeteksi pada 245bp dan Identifikasi menggunakan PCR dengan primer JB21/ JB22 dapat terdeteksi DNA *Mycobacterium bovis* dengan konsentrasi 325,5 pgmeskipun *band* yang dihasilkan sangat tipis serta primer INS1/INS2 mampu mendeteksi DNA hingga

konsentrasi 156,25 pg. Identifikasi DNA dengan menggunakan primer JB21/JB22 dan INS1/INS22 sebagai deteksi *Mycobacterium bovis* dapat diterapkan. Penelitian lebih lanjut untuk mengkaji konsentrasi terkecil DNA *Mycobacterium bovis* yang dapat dideteksi sehingga dapat digunakan untuk deteksi dini *Mycobacterium bovis* dalam tubuh berhubungan dengan infeksi terhadap penyakit TBC

DAFTAR PUSTAKA

- Brown, T. A. 1992. *Genetics : A molecular Approach Second Edition*. Chapman & Hall, London : xxii + 467 hlm
- Carter. 2004. *Essensial of Veterinary Bacteriology and Mycology 6th Ed.* Iowa : Blackwell Publishing : 207-213.

- CDC. 2009. *Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories 5th Edition*. U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health. <http://www.cdc.gov/biosafety/publications/bmbl5/bmbl.pdf> (Diakses pada tanggal 4 Mei 2013)
- De la Maza, Luis M.; Marie T. P. ; Ellen Jo Baron. 1997. *Color Atlas of Diagnostic Microbiology*. United States of America : Mosby-Year Book.
- FigueiredoEustaquio, Eduardo de Souza ; Flávia Galindo Silvestre ; Wilma Neres Campos; Leone Vinícius Furlanetto; Luciana Medeiros; Walter Lilenbaum; Leila Sousa Fonseca1; Joab Trajano Silva1 dan Vânia Margaret Flosi Paschoalin. 2009. Identification of Mycobacterium Bovis Isolates by A MultiplexPCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 40: 231-233
- Hirsh, D. C., MacLachlan, N. J. dan Walker, R. L. 2004. *Veterinary Microbiology*. Edisi ke 2. Iowa : Blackwell Publishing: 224.
- Manjunath N, Shankar P, Rajan L, Bhargava A, Saluja S, Shriniwas. 1991. Evaluation of polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis. *Tubercle.Indian Journal of C/mica/Biochemistry, Department of Microbiology, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi* ;72:21–27.
- Mülhardt, Cornel. 2003. *Der Experimentator : Molekularbiologie/ Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag Haidelberg; Berlin : 24-29.
- Quinn P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J.C. dan Leonard, F.C. 2002. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. UK : Blackwell Science : 97-102.
- Quinn, P. J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. 2004. *Clinical Veterinary Microbiology*. London : Mosby : 156-166.
- Sulandari, S. dan Zein, M.S. 2003. *Panduan Praktis Laboratorium DNA*. LIPI, Bogor.
- Timoney, J. F., Gillespie, J. H., Scott, F.W. dan Barlough, J.E. 1988. *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animals*. USA : Cornell University Press: 270-276.
- WHO. 2011. *Global tuberculosis control: WHO report*. http://www.who.int/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf (Diakses pada tanggal 4 Mei 2013)

